

Étude d'un vaccin mixte contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique

par J. M. BLANCOU (*)

(avec la collaboration technique de J. RAZAFINDRAMANANA et A. T. RATOBY)

RESUME

Un vaccin mixte contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique peut être fabriqué par addition de spores de *Bacillus anthracis* (capsulées, atténuées) à une culture totale de *Clostridium chauvoei* neutralisée par la Bêta-propiolactone. Le pH (4) n'est pas rectifié après l'addition de 1 p. 100 d'alun de potassium (adjuvant), ce qui préserve ultérieurement le vaccin des contaminations bactériennes.

A la dose de 2 ml (par voie sous-cutanée) chez les bovins, les épreuves d'innocuité et d'efficacité habituellement exigées sont respectées. Plus de six millions de doses de ce vaccin ont été employés jusqu'ici sans aucun incident ni rupture d'immunité.

L'intérêt d'un vaccin mixte contre le charbon symptomatique et le charbon bactérien est évident, lorsque ces deux affections coexistent dans une même région d'élevage. C'est le cas de la plupart des pays et, depuis quelques années, celui de Madagascar où le charbon bactérien n'a sévit seul que jusqu'en 1969 (1).

La vaccination simultanée par les deux vaccins monovalents inoculés séparément est largement répandue. Elle a été étudiée expérimentalement par plusieurs auteurs (10, 11) qui s'accordent à lui trouver une efficacité pratique égale à celle des deux vaccinations différées. C'est ce que nous avons nous même observé à Madagascar entre 1969 et 1971.

La vaccination par injection unique, avec un vaccin bivalent, est beaucoup moins répandue. Elle a été expérimentée en U.R.S.S. (2) en Iran (4) en France (5) et au Canada (3).

Ces vaccins bivalents sont constitués par le mélange d'une souche vaccinale vivante de

Bacillus anthracis à une souche de *Clostridium chauvoei* soit vivante et atténuée, soit virulente et tuée par le formol, lui-même ensuite neutralisé par le sulfate de sodium (2).

Nous avons préféré utiliser cette dernière technique, SIEIRO et ASTARLOA (9) ayant démontré la nette supériorité des anacultures par rapport aux vaccins vivants en matière d'immunité contre le charbon symptomatique. Mais notre méthode de neutralisation de la culture de *Clostridium chauvoei* est totalement différente de celle de l'anaculture formolée; nous avons choisi d'obtenir l'anaculture par la Bêta-propiolactone, qui a le double avantage de former des dérivés atoxiques antigéniques (7) et de s'hydrolyser en milieu liquide. L'anaculture résultante n'est donc plus dysgénésique pour les spores bactériennes et peut recevoir, sans la détruire, la souche vaccinale de *Bacillus anthracis*.

Ce sont les méthodes de fabrication d'un tel vaccin, et les résultats de son contrôle expérimental et pratique, qui constituent l'objet de cette étude.

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire Central de l'Elevage, B.P. 3741 Tananarive, République Malgache.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

1. Vaccin

a) Milieu de culture

• *Clostridium chauvoei* : La culture est obtenue à partir d'un milieu de formule suivante, stérilisé 1 heure à 120° :

Hydrolysate de caséine	15	g
Yeast Extract (DIFCO)	3	g
Glucose	5	g
Chlorure de sodium	3	g
Chlorhydrate de cystéine	3	g
Thioglycollate	3	g
Gélose Agar-Agar	0,7	g
Eau distillée		
q.s.p. 1 000 ml pH final : 7,2		

• *Bacillus anthracis* : La récolte de spores est effectuée après huit jours d'incubation sur gélose Martin.

b) Souches vaccinales

• *Clostridium chauvoei* : Souche virulente « 735 », isolée en 1969 d'un cadavre de bovin mort de charbon symptomatique.

• *Bacillus anthracis* : Souche atténuée « A₄₃ », capsulée, déjà décrite (8).

2. Animaux de contrôle

Cobayes : mâles, de 350 à 400 g.

Moutons : race locale, adultes, de 15 à 20 kg.

Bovins : zébus malgaches, castrés, de 12 à 24 mois.

METHODES

1. Vaccin : méthode de fabrication

Le vaccin est obtenu selon une méthode simplifiée mise au point après de nombreux essais préliminaires portant en particulier sur la dose neutralisante de Bêta-propionolactone, ainsi que la toxicité et immunogénicité résiduelle des « Bêta-propionolactone toxoïde » obtenus.

Cette méthode est la suivante :

• Culture de la souche vaccinale de *Clostridium chauvoei*, dans le milieu précédemment décrit, durant 48 heures à 37°.

• Neutralisation, dès la sortie de l'étuve, par addition de 0,5 p. 100 de Bêta-propionolactone et agitation régulière (ou intermittente, toutes les 15 mn) durant deux heures. Repos 24 h à température ambiante.

• Contrôle bactérioscopique, et addition de 1 p. 100 d'alun de potassium.

• Contrôle du pH : il doit être de 4. Cette acidité marquée, due en partie à l'hydrolyse de la Bêta-propionolactone, doit être maintenue. Elle n'altère, pas l'antigénicité du vaccin et lui évite des contaminations ultérieures.

• Addition, dans la culture neutralisée, des spores de la souche vaccinale de *Bacillus anthracis* à un titre déterminé préalablement *in vivo* sur souris (8). A ce titre, une dose vaccinale-bovin est sans danger pour lui mais tue, en moyenne, le cobaye en 72 h. Pour que la dilution de ces spores soit homogène au sein de l'anaculture, il convient d'effectuer leur « pré-mélange » dans une partie aliquote d'anaculture : il est agité vigoureusement avant d'être ajouté au reste du vaccin qui est alors réparti en flacons sous agitation continue.

2. Animaux : méthodes de contrôle

a) Innocuité :

L'innocuité du vaccin est vérifiée par inoculation intramusculaire d'une quadruple dose vaccinale à des cobayes, des moutons, des bovins.

b) Efficacité :

• L'efficacité du vaccin contre le *charbon symptomatique* est vérifiée par inoculation intramusculaire de 1 ml d'un broyat de tumeur charbonneuse en chlorure de calcium à 3 p. 100, à différentes dilutions (9). La proportion de mortalités survenues dans le groupe des sujets vaccinés est établie au seuil de dilution entraînant 100 p. 100 de mortalité chez les témoins (soit, en général 10⁻⁴ ml);

• L'efficacité du vaccin contre le *charbon bactérien* est vérifiée par inoculation sous-cutanée de 1,5 ml d'une souche virulente de *Bacillus anthracis* aux moutons, vaccinés et témoins.

RESULTATS

INNOCUITE

L'innocuité du vaccin a d'abord été établie sur cobayes et moutons. En 1972 plus de six millions de zébus ont été vaccinés, sans qu'aucun accident ne soit rapporté. Si l'inoculation vaccinale est correctement pratiquée (sous la peau de l'encolure ou de la base de la queue) il ne s'ensuit aucune réaction sauf, parfois, un œdème local ou une légère hyperthermie.

Aucun avortement ni diminution de production lactée n'ont été observés.

EFFICACITE

1. Efficacité pratique en élevage bovin

Sur plus de six millions de zébus vaccinés annuellement depuis 1971, aucun cas de charbon bactérien ou symptomatique n'a été signalé. Par contre, de nombreux foyers ont été reconnus parmi les troupeaux ayant échappé aux vaccinations, de même que chez les jeunes veaux non vaccinés.

2. Efficacité contrôlée en laboratoire

Les essais ont été conduits sur trois espèces animales : cobayes, ovins et bovins.

a) Sur cobayes :

L'efficacité est jugée sur des sujets ayant reçu une dose vaccinale bovin (2 ml) avec rappel douze jours plus tard, puis éprouvés comme indiqué précédemment. Elle ne peut concerner que le charbon symptomatique puisque la souche A₄₃, étant pathogène pour le cobaye, ne peut le vacciner.

Si l'on ne tient compte que des dilutions mortelles pour la totalité des témoins, la proportion de sujets résistants à l'épreuve est de 40 sur 56 sujets soit 71 p. 100 (47 à 84, au risque 5 p. 100).

Ce chiffre est celui observé avec les vaccins monovalents et conforme aux normes habituellement exigées (10).

b) Sur moutons :

Sur cette espèce animale l'efficacité peut être jugée, en deux temps vis-à-vis du charbon bactérien puis du charbon symptomatique.

Les sujets sont vaccinés dans les mêmes conditions que les cobayes.

Le résultat des épreuves est résumé dans le tableau I.

DUREE DE LA PROTECTION CONFEREE

Cette durée a été déterminée sur bovins, les cobayes et les moutons ayant donné des résultats décevants (protection réduite à 66 p. 100 après 3 mois et nulle au-delà de 6 mois).

Les résultats des épreuves, pratiquées sur 3 groupes de 4 bovins avec une dose mortelle pour les animaux témoins, sont donnés au tableau II.

DUREE DE CONSERVATION DU VACCIN

1. Composante « charbon bactérien »

La survie des spores de la souche A₄₃ peut être appréciée *in vitro* et *in vivo*.

TABLEAU N° I

Taux de protection contre le charbon bactérien		Taux de protection contre le charbon symptomatique	
Vaccinés	Témoins	Vaccinés	Témoins
Nombre de sujets : 12 Mortalité : Nulle	Nombre de sujets : 12 Mortalité : 12	Nombre de sujets : 18 Mortalité : Nulle	Nombre de sujets : 8 Mortalité : 8

TABLEAU N° II

Taux de protection contre le charbon bactérien			Taux de protection contre le charbon symptomatique		
Après 3 mois	Après 6 mois	Après 12 mois	Après 3 mois	Après 6 mois	Après 12 mois
4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4

TABLEAU N° III

Titrages mensuels moyen du mélange de quatre lots		
M o i s	<i>in vitro</i> Nombre de spores par ml	<i>in vivo</i> Temps moyen (en h) de mort du cobaye de 350 g
Janvier	10^6	72
Février	$10^{5,1}$	96
Mars	10^5	106
Avril	$10^{5,2}$	-
Mai	$10^{5,5}$	120
Juin	10^5	96
Juillet	$10^{4,5}$	72
Août	-	-
Septembre	-	-
Octobre	10^5	72
Novembre	$10^{4,5}$	96
Décembre	10^4	106

TABLEAU N° IV

Taux de protection obtenu avec un lot de vaccin conservé 3 - 6 et 12 mois à 10°			
Vaccin frais	Vaccin de 3 mois	Vaccin de 6 mois	Vaccin de 12 mois
Cobayes éprouvés : 56	Cobayes éprouvés : 35	Cobayes éprouvés : 35	Cobayes éprouvés : 35
Morts : 16	Morts : 20	Morts : 21	Morts : 25
Protection : 71 p.100 (56 à 82)	Protection : 43 p.100 (27 à 61)	Protection : 40 p.100 (24 à 58)	Protection : 29 p.100 (18 à 46)

Le tableau n° III rend compte du nombre de spores survivantes lors des titrages mensuels effectués sur un mélange de quatre lots, pris au hasard, ainsi que du temps moyen de mortalité des cobayes inoculés avec une dose vaccinale.

2. Composante « charbon symptomatique »

Trois lots de 12 cobayes ont été éprouvés dans les conditions décrites précédemment après vaccination par un lot (non additionné de spores A₄₃), conservé depuis 3, 6 et 12 mois à 10°.

Le résultat des épreuves figure dans le tableau ci-dessous, où l'intervalle de confiance (au risque 5 p. 100) est indiqué après le pourcentage de protection tableau n° IV.

La diminution du taux de protection est donc assez rapide surtout durant les 3 premiers mois. Mais nous avons observé le même résultat

avec les anacultures formolées monovalentes couramment commercialisées : le phénomène n'est donc pas lié à la méthode de neutralisation ou de conservation du vaccin bivalent.

Par contre la même expérience, réalisée sur 8 bovins, démontre que le vaccin garde toute sa valeur après 12 mois. Ceci confirme les observations de MACHEAK et CLAUS (6) sur la moindre valeur qu'il faut accorder aux contrôles d'immunité sur cobayes.

DISCUSSION - CONCLUSION

Le vaccin mixte objet de cette étude nous paraît présenter de nombreux avantages :

- Simplicité et rapidité de fabrication. La neutralisation par la Bêta-propiolactone fait gagner cinq jours sur la méthode classique

de l'anaculture formolée, et ne nécessite pas d'étuvage durant la neutralisation;

- Economie dans sa fabrication et son utilisation, en personnel et en matériel;
- Innocuité et efficacité égales à celles des deux vaccins monovalents correspondants.

Bien que d'autres procédés de fabrication d'un vaccin mixte contre les charbons soient concevables, les caractéristiques précédemment soulignées nous paraissent les plus favorables à une fabrication et une utilisation à grande échelle dans les pays d'élevage extensif.

SUMMARY

Study of a mixed vaccine against black-leg and anthrax

A vaccine against black leg and anthrax is prepared from spores of *Bacillus anthracis* (attenuated, capsulated) mixed in whole culture of *Clostridium chauvoei* killed by Beta-propiolactone. After precipitation by 1 p. 100 potassium alum, vaccine is kept at pH 4 so that bacterial contaminations are impossible.

A subcutaneous injection (2 ml in cattle) is harmless, and effective against the two diseases according to usual standards. More than 6 millions of cattle have been vaccinated without any trouble of failure of protection.

RESUMEN

Estudio de una vacuna mixta contra el carbunco bacteridiano y el carbunco sintomático

Se puede fabricar una vacuna mixta contra el carbunco bacteridiano y el carbunco sintomático por añadido de esporas de *Bacillus anthracis* (capsuladas, atenuadas) en un cultivo total de *Clostridium chauvoei* neutralizado por la beta-propiolactone. No se rectifica el pH (4) después del añadido de 1 p. 100 de alumbre de potasio (adjuvante), lo que ulteriormente preserva la vacuna de las contaminaciones bacterianas.

Las pruebas de inocuidad y de eficacia de dicha vacuna respetan las normas cuando se inyecta por vía subcutánea la dosis de 2 ml en bovinos.

Hasta ahora se utilizaron más de 6 millones de dosis de esta vacuna sin accidente ni supresión de inmunidad.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLANCOU (J.M.), RAKOTOARIVELO (J.), SERRES (H.). Note sur les premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1971, **24** (1): 19-24.
2. BURDOV (A. N.). Simultaneous immunization of farm animals against aerobic and anaerobic infections: combined vaccine against anthrax, malignant oedema and black-leg. *Trudy vsesoyuz Inst. eksp. Vet.*, 1962, **26**: 139-144.
3. CHO (H. J.). Demonstration of complement fixing antibody in the sera of cattle vaccinated with combined living black-leg anthrax vaccine. *Canad. J. comp. Med.*, 1971, **35** (4): 155-159.
4. DELPY (L. P.). Méthodes d'immunisation active contre les pasteurelloses septicémiques. *Off. int. Epiz. vingtième session*, 1952, Rapport N° 246.
5. I.S.T. Asyntrax, vaccin mixte, vivant, stabilisé, avirulent contre les charbons symptomatique et bactérien, (document I.S.T., 1969).
6. MACHEAK (M. E.), CLAUS (K. D.). Responses of hamsters and guinea-pigs to antigens of *Clostridium chauvoei*, *Am. J. vet. Res.*, 1972, **33** (5): 1039-1044.
7. RAYNAUD (M.), BLASS (J.), TURPIN (A.). Mécanisme de la détoxification des toxines par le formol: Etude de deux nouveaux dérivés atoxiques antigéniques: 2-4 dinitrofluorobenzène toxoïde et bêta-propiolactone toxoïde. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 1957, **24**: 862-863.
8. RIBOT (J. J.), GILBERT (J.). Titrages de virulence du vaccin anti-charbonneux sur souris. Résultats expérimentaux et application pratique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **18** (1): 9-17.
9. SIEIRO (F.), ASTARLOA (F.). A potency test in guinea pigs for the evaluation of *Clostridium chauvoei* bacterins. *Am. J. vet. Res.*, 1964, **25** (109): 1785-1787.
10. SIMPSON (R. M.). A study of the immunity produced in cattle by simultaneous inoculation with a number of vaccines. *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12**: 405-428.
11. STARTEW (I. S.). Simultaneous prophylactic inoculation of cattle with anti-anthrax glucoside vaccine and black-leg formol vaccine. *Sovyet. Vet.*, 1939, **4**: 29-30.